胰凝乳蛋白酶抑制剂在蓖麻蚕主要组织中的分布及血液中的含量和活性

赵　萍[1]，张　艳[1]，钟晓武[1]，王凌燕[1]，谭　祥[1]，董照明[1]，莫现会[2]，夏庆友[1,*]

（1. 西南大学，家蚕基因组生物学国家重点实验室，重庆 400716；2. 广西蚕业科学研究院，南宁 530007）

摘要：【目的】蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 属于鳞翅目昆虫，其体内存在的胰凝乳蛋白酶抑制剂(chymotrypsin inhibitor, CI)对蓖麻蚕的正常生长发育和自身防御能力有重要的作用。获得蓖麻蚕的CI种类分布信息，以及研究各种CI的功能，可以为鳞翅目害虫的生物防治提供理论依据。【方法】本实验通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE)和CI活性染色技术，对18个蓖麻蚕品系的主要组织器官中胰凝乳蛋白酶抑制剂的多态性分布进行了调查，并对各品系血液中的蛋白含量和CI活性进行了测定。【结果】在pH 8.6电泳下，各品系血液中共检测到7条CI活性带，在pH 4.0电泳下，各品系血液中可检测到3条CI活性带；血液中的CI含量从5龄第3天幼虫期到化蛹当天一直维持着很高的含量；头、体壁和脂肪体中的CI都不如血液中的CI含量高，而丝腺中未检测到任何CI。【结论】与家蚕 *Bombyx mori* 血液中的含量相比，蓖麻蚕血液中的CI含量更高，CI种类多态性分布不仅体现在不同品系的同一组织，还体现在同一品系的不同组织。

关键词：蓖麻蚕；家蚕；组织器官；胰凝乳蛋白酶抑制剂；比活性

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2016)02-138-10

Distribution of chymotrypsin inhibitors in major tissues and their content and activity in the hemolymph of the eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae)

ZHAO Ping[1], ZHANG Yan[1], ZHONG Xiao-Wu[1], WANG Ling-Yan[1], TAN Xiang[1], DONG Zhao-Ming[1], MO Xian-Hui[2], XIA Qing-You[1,*] (1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. General Station for Sericulture Technology Popularization of Guangxi, Nanning 530007, China)

Abstract:【Aim】The Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*, is a lepidopteran insect. Chymotrypsin inhibitors (CI) play important roles in the development and defense of the Eri-silkworm. The analysis of the polymorphism of CIs between different strains and the functional study of CIs in the Eri-silkworm could provide theoretical evidence for controlling Lepidoptera insects.【Methods】We investigated CIs in major tissues of 18 strains of *S. cynthia ricini* by using pH 8.3 and pH 4.0 native polyacrylamide gel electrophoresis. At the same time, the total protein content and CI activity in the hemolymph were determined.【Results】Seven CIs were found in the hemolymph of different strains of *S. cynthia ricini* in the pH 8.3 PAGE, and three CIs were found in the pH 4.0 PAGE. The CIs in the hemolymph maintained very high level from the 3rd day of the 5th instar larvae to the 1st day of the pupae. CIs had relative lower contents in the head, integument and fat body than in the hemolymph, and could not be detected

基金项目：国家自然科学基金项目(31201853, 31472154)；西南大学博士基金项目(swu113113)

作者简介：赵萍，女，1963年生，四川绵阳人，博士，教授，研究方向为昆虫免疫学，E-mail：zhaop@swu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：xiaqy@swu.edu.cn

收稿日期 Received：2015-11-09；接受日期 Accepted：2016-01-08

in the silkgland.【Conclusion】The expression level of CIs in *S. cynthia ricini* is higher than that in the silkworm, *Bombyx mori*. The polymorphism of CIs in *S. cynthia ricini* means that CIs vary in the same tissue of different stains and different tissues of the same strain.

Key words: *Samia cynthia ricini*; *Bombyx mori*; tissue and organ; chymotrypsin inhibitor; specific activity

胰凝乳蛋白酶抑制剂(chymotrypsin inhibitor, CI)属于丝氨酸蛋白酶抑制剂,广泛存在于植物、动物和微生物体内,通过抑制或者降低胰凝乳蛋白酶的活性,在多个生物学过程中发挥调节作用,维持生物体的正常生长发育(Suzuki and Natori, 1985; Frobius *et al*., 2000)。Habu 等(1992)发现四棱豆 *Psophocarpus tetragonolobus* 的 Kunitz 胰凝乳蛋白酶抑制剂 WCI(winged bean chymotrypsin inhibitor)由至少含有 7 个成员的多基因家族编码。Tsybina 等(2004)在小麦种子中分离到 BWI-1c, BWI-2c, BWI-3c 和 BWI-4c 4 种低分子量的丝氨酸蛋白酶抑制剂和一种大分子的胰凝乳蛋白酶抑制剂 WSZ1,它们对酸碱和温度都有很高的稳定性。在蜜蜂中发现了 3 种胰凝乳蛋白酶抑制剂 AMCI-1 ~ AMCI-3,这 3 者之间具有很高的同源性,都对牛 α-胰凝乳蛋白酶有明显抑制作用(Bania *et al*., 1999; Cierpicki *et al*., 2000)。Kanost (1990) 从烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫血液中纯化了 4 种丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中 1 种对猪胰肽酶和牛胰凝乳蛋白酶有抑制作用。沙漠蝗虫 *Schistocerca gregaria* 中也发现了相似的胰凝乳蛋白酶抑制剂,目前已经分离到其中的 5 种,其中 SGPI-1 抑制胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶, SGPI-2 抑制胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶, SGPI-3, SGPI-4 和 SGPI-5 只抑制胰凝乳蛋白酶(Mer *et al*., 1996)。Rai 等(2010)从柞蚕 *Antheraea pernyi* 血液中纯化到一种 AmPI,可以抑制胰凝乳蛋白酶,推测其在柞蚕的防御机制中起重要作用。

在鳞翅目昆虫中,家蚕 *Bombyx mori* 的胰凝乳蛋白酶抑制剂研究较为系统和全面。家蚕的 CI 分布具有丰富的多态性,且在家蚕的整个生长发育时期都表达,具有重要的生理作用。Fujii 等(1996a, 1996b)根据聚丙烯酰胺凝胶电泳和 CI 活性染色,发现家蚕血液中至少存在 16 种以上的胰凝乳蛋白酶抑制剂,按其电泳速度分为 CI-1 ~ CI-13 等。目前,已从家蚕血液中分离纯化出多种 CI 蛋白,分析了其基本理化性质、表达模式、氨基酸序列和基因组结构等,并对其功能进行了初步研究。Fujii 等(1989)从家蚕血液中分离纯化到 CI-13,该蛋白分子量为 14 kDa, pI 为 4.1。Deng 等(1990)从家蚕血液中分离到 2 种 CIs(CI-1 和 CI-2),分子量分别为 10.4 和 7.9 kDa, pI 分别为 7.12 和 7.00。赵萍等(2007)对 CI-9 进行分离纯化、克隆和理化性质研究,认为 CI-9 是一种低分子量,对温度和酸碱稳定的酸性 Kunitz 类型 CI,与其他家蚕 CI 比较, CI-9 的比活性最强。Liu 等(2014)从家蚕脂肪体中克隆了 SW-AT-1 并获得了表达蛋白,发现 SW-AT-1 在 pH 4 ~ 10 都能保持活性。作者还通过突变的方法发现了 SW-AT-1 的活性位点。

蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 和家蚕同属于鳞翅目昆虫,而鳞翅目昆虫是农业和森林害虫的主要种类,每年给世界农业林业造成难于估量的损失。蓖麻蚕属于野生类型的无滞育期多化性鳞翅目昆虫,其生存环境与野外害虫更为接近,为探讨胰凝乳蛋白酶抑制剂(CI)在蓖麻蚕品系间的多态性分布和生理功能,为鳞翅目害虫防治提供一些参考依据,本研究利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE)和活性染色方法,调查分析了 18 个蓖麻蚕品系的时期和组织分布差异性,并与家蚕的 CI 分布进行了比较。

1　材料和方法

1.1　供试虫源及主要试剂

以广西壮族自治区蚕业技术推广总站惠赠的 678、广白黄、B2、小花白、高白、南一、朝白、桂 B、681、素白、白有、申蓝、B4、花黄、花青黄、白黄、樗花黄和兰花共 18 个蓖麻蚕品系作为实验材料,以本实验室基因库保存的大造、21-872、17-161、05-310、19-610 和 05-033 共 6 个品系作为实验对照。

胰凝乳蛋白酶、N-acetyl-D, L-phenylalanine-β-naphthylester 和 N, N′-dimethylformamide 等购于 Sigma 公司,聚丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等其他药品购于上海生工。

1.2　样品采集和组织蛋白质提取

分别取供试蓖麻蚕品系 4 眠、5 龄起蚕、5 龄饷食 12 h、5 龄第 3 天、5 龄第 5 天、上蔟第 1 天、吐丝完毕和化蛹当天的蚕体血液。用针刺破腹足,在冰上收集血液置于加有少量苯基硫脲的离心管中,在

4℃下经 12 000 r/min 离心 20 min，吸取上清然后分装至离心管置于 -20℃保存备用。

分别解剖供试蓖麻蚕品系上述发育时期蚕体，取出头、体壁、脂肪体和丝腺组织，用预冷的 0.75% 生理盐水洗涤后迅速放置于离心管中，于 -20℃保存备用。称取各组织约 0.1 g 于研钵中，加入液氮，迅速研磨至粉状，使组织细胞充分破碎。把粉末转移入 1.5 mL 的离心管中，加入 0.5 mL pH 7.4 磷酸缓冲液使其充分裂解，然后 12 000 r/min 4℃离心 30 min，取上清然后分装至离心管中，-20℃保存备用。

1.3 蛋白质的定量

以牛血清白蛋白(BSA)作为蛋白质定量标准，将血液稀释 30 倍，根据 Bradford(1976)法，测定蛋白质的浓度，计算各品系血液中的蛋白质质量浓度(mg/mL)。

1.4 胰凝乳蛋白酶抑制剂活性测定

参照赵萍等(2003)的方法在 0.1 mL 的 0.05 g/L α-胰凝乳蛋白酶溶液(pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液溶解)中加入 0.1 mL pH 7.4 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(对照)或者不同浓度的蓖麻蚕血液样品(pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释)，在 37℃中孵育 10 min，使混合溶液充分反应，加入 0.1 mL 的 2% 酪蛋白(pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液溶解)，进一步在 37℃中孵育 10 min，加入 1.5 mL 的 6.6% 三氯乙酸(TCA)停止反应，室温下经 3 000 r/min 离心 20 min，取上清液在紫外分光光度计用波长 280 nm 测定吸光度。血液 CI 的抑制率按下列公式求出：

抑制率 =(无 CI 存在下胰凝乳蛋白酶活性CI - 存在下胰凝乳蛋白酶活性)/无 CI 存在下胰凝乳白蛋白酶活性 ×100%。

把抑制率为50% 的 CI 量作为 1 个 CI 活性单位。

1.5 各组织样品非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE)

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE)或称为活性电泳是在不加入 SDS 和巯基乙醇等变性剂的条件下，对保持活性的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，该方法根据蛋白质的分子量、等电点和形状等特性进行分离。参照 Davis(1964)的方法。对供试品系不同发育时期的各组织样品分别在 4℃ pH 8.3 的 Glycine · Tris 缓冲液和 pH 4.0 的醋酸钾缓冲液中用 3.3% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行碱性和酸性 Native-PAGE，样品在浓缩胶中以 20 mA 恒定电流电泳 1 ~2 h，当指示剂(碱性电泳用溴酚蓝，酸性电泳用甲基绿)进入分离胶后，换为 30 mA 恒定电流电泳 3 ~4 h。

1.6 胰凝乳蛋白酶抑制剂活性染色方法

各组织样品经 Native-PAGE 后，凝胶中的 CI 活性参考 Uriel 和 Berges(1968)的方法进行检测：将凝胶置于 0.07% 的胰凝乳蛋白酶溶液中，37℃孵育 20 min后，除去蛋白酶溶液，用 Milli-Q 水清洗 2 次后，室温静置 15 min，加入 0.1% 邻联茴香胺染色液和 0.2% N-acetyl-D, L-phenylalanine-β-naphthylester 基质液的混合液进行染色，并于 37℃孵育 20 min，除去基质染色混合液，最后加入 2% 醋酸溶液停止反应，整个染色过程需要避光。活性染色原理如下：底物 N-acetyl-D, L-phenylalanine-β-naphthylester 可以被胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶水解，水解后的物质与染色液反应会使凝胶背景被染上亮紫红颜色。但酶-抑制剂复合物对该底物没有水解活性，所以在有抑制剂的区域就没有被染上颜色而出现了白色亮带，并且白色亮带的浓淡反应了抑制剂活性的强弱。

2 结果

2.1 不同蓖麻蚕品系血液中 CI 的分析

不同蓖麻蚕品系血液经 pH 8.3 和 pH 4.0 的 Native-PAGE 和 CI 活性染色，其 CI 种类分布电泳图谱如图 1 和图 2 所示。图 1 结果表明，在碱性电泳条件下 18 个蓖麻蚕品系中共检测到 5 条活性带，分别命名为 E-CI1, E-CI-2, E-CI3, E-CI4 和 E-CI5，5 种 CIs 的等电点依次减小。该结果与赵秀振等(2007)在其他品系检测的结果基本一致。E-CI1, E-CI2 和 E-CI3 的等电点相近，在所有的品系中都表现极强的活性；而 E-CI4 和 E-CI5 的等电点接近，在不同品系间带型不同，有 2 种同时表达和 1 种分别表达的现象。如在樗花黄、白黄、681、678、B2、南一、小花白、白有、高白、申蓝和素白 11 个品系中同时检测到 E-CI4 和 E-CI5；但花青黄只有 E-CI4 表达，广白黄、高白、朝白、桂 B、花黄和兰花 6 个品系中只检测到 E-CI5。因此，我们推测这两种抑制剂功能较相似。与家蚕 CI 种类分布电泳图谱对比，蓖麻蚕的 CI 种类主要集中分布在家蚕 CI-8 的上方，表明大部分为中性蛋白和弱酸性蛋白。

从图 2 我们还可以看出，在 pH 4.0 的 Native-PAGE 中，18 个蓖麻蚕品系的血液中共检测到 3 条活性带，分别命名为 E-CIa, E-CIb 和 E-CIc。3 种 CIs 存在于所有供试品系中，在品系间的活性一致，

其中 E-CIb 比 E-CIa 和 E-CIc 的活性强。与赵秀振等(2007)的调查结果相比,E-CIc 是新检测到的 1 条抑制剂条带。与之对照的家蚕血液中检测出 4 条抑制剂条带,它们分别是 CI-b1, CI-b2, CI-b3 和 CI-b4。根据电泳迁移度分析蓖麻蚕中检测到的 3 条抑制剂带与家蚕的 4 条抑制剂条带位置无一致关系。

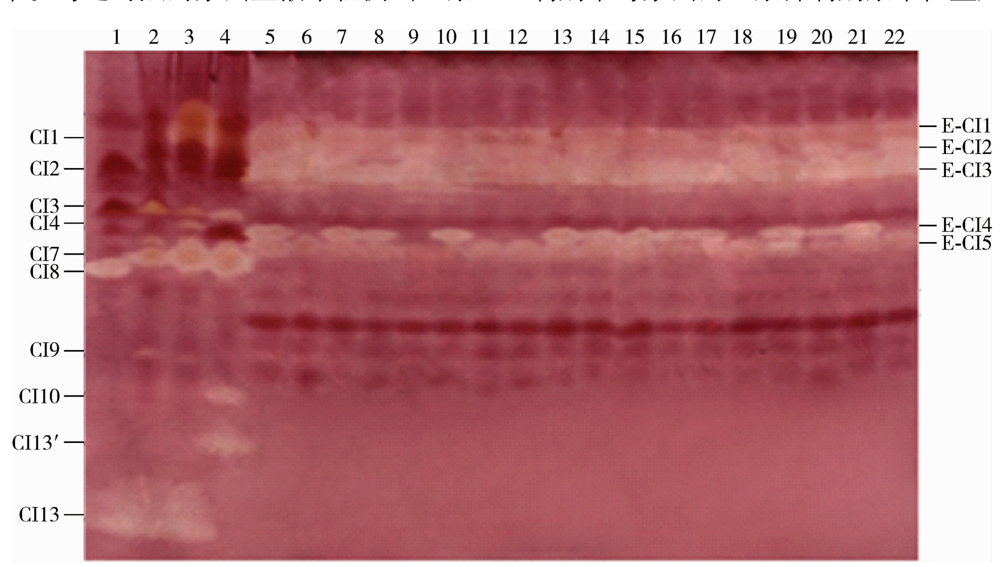


图 1　蓖麻蚕不同品系血液中 CI 的碱性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1　Electrophoretic patterns of CIs in the hemolymph of different strains of the Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*, by pH 8.3 native-PAGE

1－4：家蚕品系血液 Silkworm hemolymph (CK)：1：大造 Dazao；2：21-872；3：17-161；4：05-310；5－22：蓖麻蚕品系血液 Eri-silkworm hemolymph：5：678；6：广白黄 Guangbaihuang；7：B2；8：小花白 Xiaohuabai；9：高白 Gaoba；10：南一 Nanyi；11：朝白 Zhaobai；12：桂 B Gui B；13：681；14：素白 Subai；15：白有 Baiyou；16：申蓝 Shenlan；17：B4；18：花黄 Huahuang；19：花青黄 Huaqinghuang；20：白黄 Baihuang；21：樗花黄 Cuhuahuang；22：兰花 Lanhua.

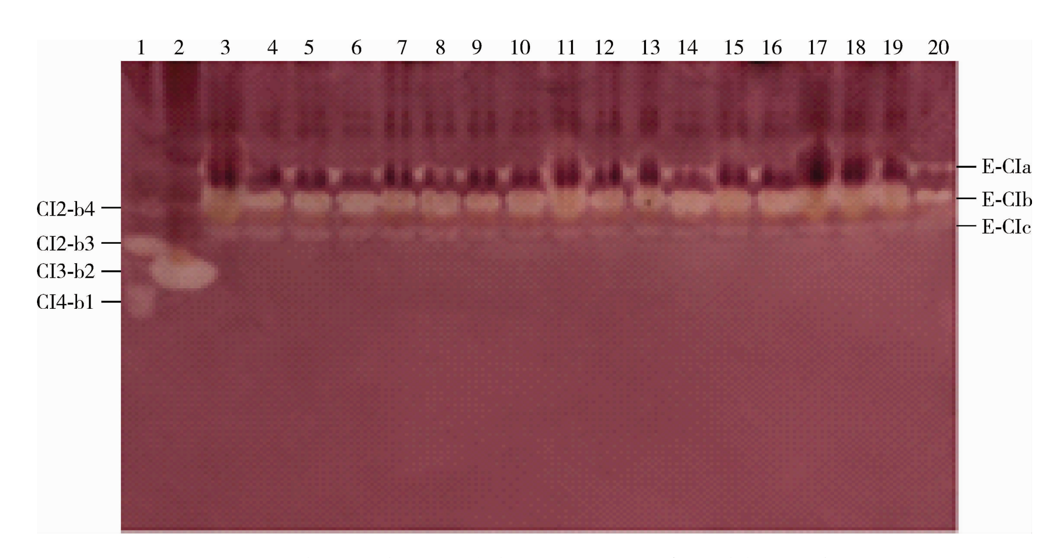


图 2　蓖麻蚕不同品系血液中 CI 的酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2　Electrophoretic patterns of CIs in the hemolymph of different strains of the Eri-silkworm, *Samia cynthia ricinis*, by pH 4.0 native-PAGE

1－2：家蚕品系血液 Silkworm hemolymph (CK)：1：19-610；2：05-033；3－20：蓖麻蚕品系血液 Eri-silkworm hemolymph：3：678；4：广白黄 Guangbaihuang；5：B2；6：小花白 Xiaohuabai；7：高白 Gaobai；8：南一 Nanyi；9：朝白 Zhaobai；10：桂 B Gui B；11：681；12：素白 Subai；13：白有 Baiyou；14：申蓝 Shenlan；15：B4；16：花黄 Huahuang；17：花青黄 Huaqinghuang；18：白黄 Baihuang；19：樗花黄 Cuhuahuang；20：兰花 Lanhua.

2.2　不同蓖麻蚕品系主要组织中 CI 的分析

经 Native-PAGE 和 CI 活性染色,获得 18 个蓖麻蚕品系的头、体壁、脂肪体、血液、丝腺等组织器官 CI 种类分布的电泳图谱(图略)。分析电泳图谱,发现蓖麻蚕血液中检测到的 CI 种类最多,覆盖了其他组织的所有 CI 种类。图 3 为申蓝品系 5 龄第 5 天

不同组织器官中 CI 的分布图，共包括 E-CI1，E-CI2，E-CI3，E-CI4，E-CI5，E-CI6，E-CI7，E-CIa，E-CIb 和 E-CIc 等带型。在申蓝血液中，随着血液上样量的增加，在图 3(A)的第 2 泳道中新检测到 E-CI6 和 E-CI7，表明 E-CI6 和 E-CI7 含量较低，只有在上样量足够大时才能检测到，这与赵秀振(2007)等的结果一致。头部和体壁中含有 E-CI1，E-CI2，E-CI4，E-CI5，E-CIa 和 E-CIb，脂肪体中含有 E-CI2，E-CI4，E-CI7，E-CIa 和 E-CIb。根据电泳图谱将蓖麻蚕不同品系的主要组织器官中 CI 种类的分布进行统计，如表 1 所示。从表 1 中我们可以看出，在碱性电泳中，同一品系不同的组织器官间 CI 种类存在多态性分布，而不同品系同一组织间 CI 分布也存在多态性。如：在同一品系头部器官中可以检测到 E-CI2 和 E-CI4，在体壁中可以检测到 E-CI1，E-CI2，E-CI4 和 E-CI5 等；在不同品系的脂肪体中，只有在申蓝、681、朝白、白黄、B4 和 B2 中才能检测到抑制剂条带。在酸性电泳中，无论是品系间还是组织间 CI 种类分布基本一致，无多态性。在 18 个蓖麻蚕品系的丝腺中没有检测到任何一种 CI。

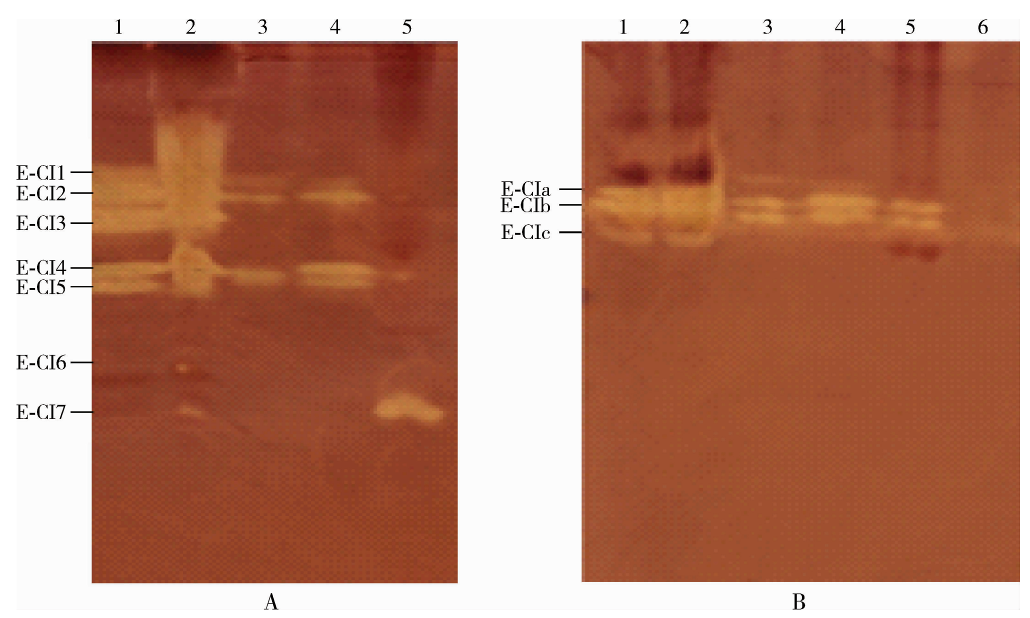


图 3 蓖麻蚕申蓝品系血液及其他组织中 CI 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 3 Electrophoretic patterns of CIs in the hemolymph and other tissues of the Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* strain Shenlan, by native-PAGE

A：碱性电泳 Native-PAGE gel pattern in the alkaline buffer；B：酸性电泳 Native-PAGE gel pattern in the acid buffer. 1, 2：血液 Hemolymph；3：头 Head；4：体壁 Integument；5：脂肪体 Fat body；6：丝腺 Silkgland.

表 1 不同蓖麻蚕品系主要组织中 CI 种类的分布

Table 1 Distribution of CIs in major tissues of different strains of the Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*

品系 Strains	组织 Tissues	E-CI1	E-CI2	E-CI3	E-CI4	E-CI5	E-CI6	E-CI7	E-CIa	E-CIb	E-CIc
申蓝 Shenlan	头 Head	+	+		+	+				+	+
	体壁 Integument	+	+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body		+		+			+		+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
桂 B Gui B	头 Head		+		+					+	+
	体壁 Integument	+	+	+			+	+		+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+		+	+	+	+	+	+
素白 Subai	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+	+			+	+		+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
681	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body		+		+			+		+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

续表 1　Table 1 continued

品系 Strains	组织 Tissues	E-CI1	E-CI2	E-CI3	E-CI4	E-CI5	E-CI6	E-CI7	E-CIa	E-CIb	E-CIc
高白 Gaobai	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+							+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+		+	+	+	+	+	+
樗花黄 Cuhuahuang	头 Head									+	+
	体壁 Integument		+		+	+	+			+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
朝白 Zhaobai	头 Head									+	+
	体壁 Integument		+		+	+	+	+		+	+
	脂肪体 Fat body		+		+			+		+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+		+	+	+	+	+	+
白有 baiyou	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
广白黄 Guangbaihuang	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+							+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+		+	+	+	+	+	+
花黄 Huahuang	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+	+			+			+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+		+	+	+	+	+	+
678	头 Head									+	+
	体壁 Integument		+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白黄 Baihuang	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+		+	+	+			+	+
	脂肪体 Fat body		+		+			+		+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
南一 Nanyi	头 Head									+	+
	体壁 Integument		+							+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B4	头 Head									+	+
	体壁 Integument		+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body		+		+			+		+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B2	头 Head		+		+					+	+
	体壁 Integument		+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body		+		+			+		+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
小花白 Xiaohuabai	头 Head									+	+
	体壁 Integument		+		+	+				+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
兰花 Lanhua	头 Head		+		+					+	+
	体壁 Integument		+		+	+	+			+	+
	脂肪体 Fat body									+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+		+	+	+	+	+	+
花青黄 Huaqinghuang	头 Head		+							+	+
	体壁 Integument		+	+	+					+	+
	脂肪体 Fat body					+				+	+
	血液 Hemolymph	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2.3 蓖麻蚕不同发育阶段 CI 活性的变化

在碱性条件下对蓖麻蚕不同发育阶段血液中 CI 的活性进行了检测，以 B2 品系为例，结果如图 4 所示，实验中设立 4 个家蚕品系的已知 CI 活性带的检出效果来确定实验的可信度。结果表明 4 个家蚕品系的 CI 活性带全部清楚检出，与文献报道的结果一致(赵萍等，2003)。从 B2 品系不同发育阶段血液中 CI 活性的变化看，E-CI1 ~ E-CI3 从 4 眠开始表达，活性逐渐增强，5 龄第 3 天活性显著增强，直至化蛹仍保持较强的活性。E-CI5 从 5 龄起蚕开始表达，随后活性无显著增强，5 龄第 3 天当 E-CI4 活性显著增强的同时，E-CI5 活性反而消失。E-CI6 和 E-CI7 在 5 龄第 5 天活性能明显检出，蛹期活性减弱，难以检测。

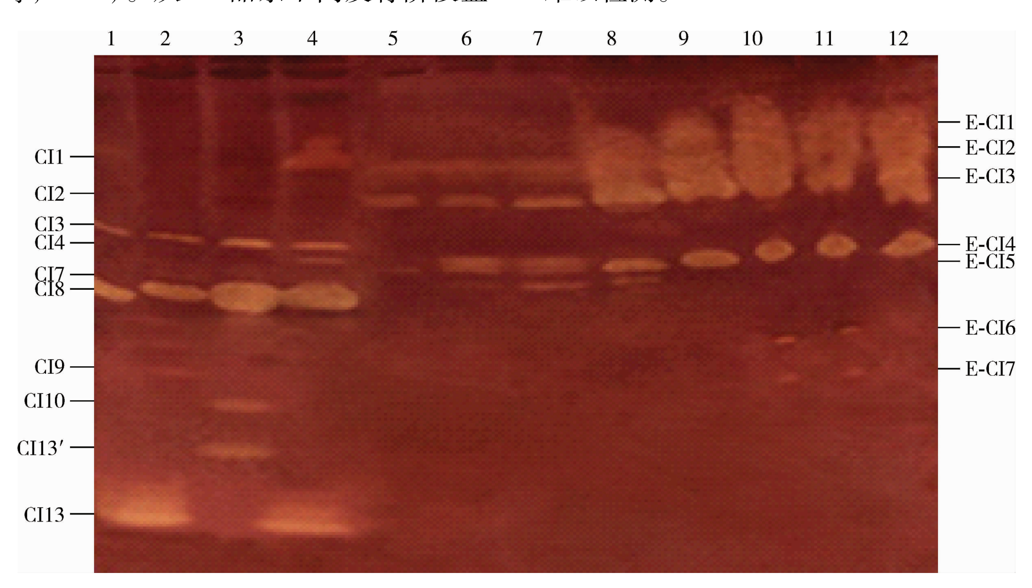


图 4 蓖麻蚕品系 B2 不同时期血液中 CI 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoretic patterns of CIs in the hemolymph of *Samia cynthia ricini* strain B2 at various developmental stages by pH 8.3 native-PAGE

1 – 4：家蚕品系血液 Hemolymph from silkworm strain (CK)：1：大造 Dazao；2：21-872；3：05-310；4：17-161；5 – 12：蓖麻蚕品系 B2 血液 Hemolymph from the Eri-silkworm strain B2：5：4 龄眠 4th molter；6：5 龄起蚕 Early 5th instar larva；7：5 龄饷食 12 h 12 h feeding of the 5th instar larva；8：5 龄第 3 天 3rd day of the 5th instar larva；9：5 龄第 5 天 5th day of the 5th instar larva；10：上簇第 1 天 1st day of wandering larva；11：吐丝完毕 Just after spinning；12：化蛹当天 1st day of pupa.

以兰花品系为例分析不同发育时期体壁中 CI 的变化(图 5)，结果表明体壁中 E-CI1，E-CI2，E-CI4 和 E-CI5 从 5 龄第 5 天开始活性明显增强，直到吐丝完毕仍有较强的活性，在蛹期活性减弱，E-CI3 在整个发育阶段表达量低。通过对其他组织检测结果发现一个共同的现象，组织中的 CI 活性不如血液中强。

2.4 不同蓖麻蚕品系血液的蛋白含量和 CI 活性的测定

18 个蓖麻蚕品系每毫升血液中蛋白质总量和全活性测定结果见表 2。申蓝的蛋白质含量最高，其次为朝白，678 最低；而总活性则是 B2 最高，其次为白有，花青黄最低。从比活性(每毫克蛋白质含活性单位)分析发现，678 最高，为 68.44 U/mg，南一其次，为 28.94 U/mg，花青黄最低，为 5.41 U/mg。结果说明 CI 的活性与品系中蛋白质含量没有关系。

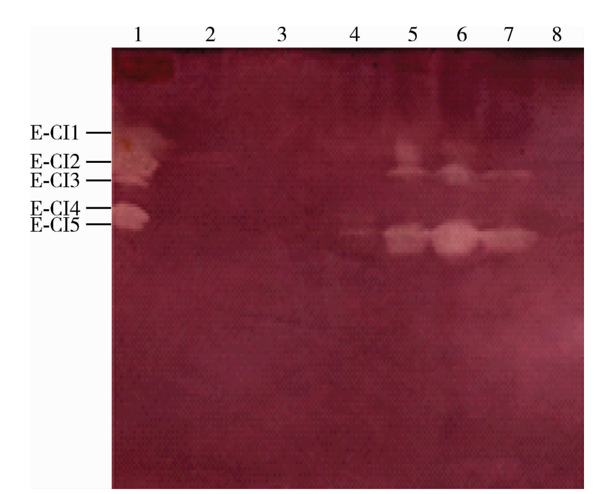


图 5 蓖麻蚕兰花品系不同发育时期体壁的 CI 检测电泳图谱

Fig. 5 Electrophoretic patterns of CIs in the integument of *Samia cynthia ricini* strain Lanhua at various developmental stages by pH 8.3 native-PAGE

1：4 龄眠 4th molter；2：5 龄起蚕 Early 5th instar larva；3：5 龄饷食 12 h 12 h feeding of the 5th instar larva；4：5 龄第 3 天 3rd day of the 5th instar larva；5：5 龄第 5 天 5th day of the 5th instar larva；6：上簇第 1 天 1st day of wandering larva；7：吐丝完毕 Just after spinning；8：化蛹当天 1st day of pupa.

表 2　18 个蓖麻蚕品系血液的蛋白质浓度和 CI 活性比较

Table 2　Comparison of the total protein concentration and CI specific activity in the hemolymph of 18 strains of the Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*

品系 Strains	总蛋白浓度(mg/mL) Total protein concentration	CI 总活性(U/mL) Total CI activity	CI 比活性(U/mg) Specific activity of CI
桂 B Gui B	95.04	2 118.67	22.29
高白 Gaobai	83.71	2 263.19	27.04
素白 Subai	78.13	2 209.81	28.28
678	28.85	1 974.44	68.44
681	134.96	2 157.57	15.99
南一 Nanyi	72.37	2 094.68	28.94
白黄 Baihuang	84.25	2 001.60	23.76
兰花 Lanhua	67.88	1 716.10	25.28
小花白 Xaiohuabai	92.16	2 018.68	21.90
B4	139.64	1 965.50	14.08
花黄 Huahuang	110.14	2 213.50	20.10
B2	124.52	2 379.36	19.11
白有 Baiyou	111.22	2 326.46	21.37
申蓝 Shenlan	176.87	2 326.46	13.15
广白黄 Guangbaihuang	137.54	1 518.45	11.04
樗花黄 Cuhuahuang	141.88	1 239.42	8.74
朝白 Zhaobai	152.10	1 274.09	8.38
花青黄 Huaqinghuang	143.84	777.93	5.41

3　讨论

胰凝乳蛋白酶抑制剂是一类可以抑制胰凝乳蛋白酶水解活性的小分子多肽,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂,不仅在昆虫正常的生长发育和免疫防御中起着重要作用,而且在害虫控制中具有潜在的利用价值,因而受到世界上不少学者的重视(Carrell, 1988; Christeller, 2005)。昆虫的血液、中肠、脂肪体等许多器官中存在胰凝乳蛋白酶抑制剂。本文借助对家蚕 CI 的研究方法和实验经验,以家蚕品系为对照,通过碱性和酸性非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 CI 活性染色,调查了 18 个蓖麻蚕品系的血液及其主要组织中胰凝乳蛋白酶抑制剂在品系间的多态性分布。在碱性 Native-PAGE 中,家蚕血液中检测到 CI1, CI2, CI3, CI4, CI7, CI8, CI9, CI10, CI13′和 CI13 共 10 种 CIs(李娟等, 2006),在蓖麻蚕中检测到 7 种 CIs,分别命名为 E-CI1, E-CI2, E-CI3, E-CI4, E-CI5, E-CI6 和 E-CI7。家蚕品系间血液中的 CI 分布具有丰富的多态性,而蓖麻蚕品系间血液中 CI 分布无明显的多态性,但表达量都较家蚕高。在酸性 Native-PAGE 中,家蚕血液中共检测到 CIb1, CIb2, CIb3 和 CIb4 共 4 种 CIs,品系不同 CI 分布的种类差异极明显,与碱性电泳的结果一致。而在蓖麻蚕血液中检测到 3 种 CIs,命名为 E-CIa, E-CIb 和 E-CIc,其在品系间分布一致,无多态性。根据电泳迁移度可以看出这 3 种 CIs 的等电点都比家蚕 CI 的等电点小,推测不是家蚕 CI 的同源物。

蓖麻蚕品系的头、体壁、脂肪体、丝腺等组织器官中发现的 CI 在血液中都能检测到,这是由于昆虫血液是开放性循环系统,其他器官合成的 CI 会进入到血液中。已有的研究表明胰凝乳蛋白酶抑制剂的功能可能与免疫相关。比如,He 等(2003, 2004)对 CI-b1 的研究证实了这个推测,认为 CI-b1 是一种脂多糖结合蛋白,并且是唯一结合于大肠杆菌的 CI,其结合可能与脂多糖有关。因此,推测 CI-b1 可能具有对微生物入侵的抗性,或与血液中其他物质反应以应对感染。在蓖麻蚕的多个组织器官中,都检测到大量的 CI,这可能与蓖麻蚕生活在野外,具有更强的抗逆作用有关。

本实验发现,蓖麻蚕血液中的 CI,从 5 龄第 3 天开始活性明显增强,直到化蛹仍有较强的活性。在组织中 CI 的活性也是从 5 龄第 3 天开始增强,到上蔟达到最大,但是化蛹后基本没有活性了。在整个发育进程中,组织中的 CI 活性不如血液中的 CI 活性强。本实验的研究结果与 Eguchi 等(1986)的研究吻合,Eguchi 等(1986)发现家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂从胚胎发育的前期到成虫期都有表达,特别

是幼虫最后一个龄期表达量迅速增加，血液、脂肪体等部位都有大量的胰凝乳蛋白酶抑制剂存在，吐丝时表达量达到最大。说明蓖麻蚕在最后一个龄期合成并贮存了大量的蛋白质供后期发育和变态所需。

家蚕和蓖麻蚕不但分类不同，而且其生存状态也有较大差异。家蚕是经过了五千年的人工驯化而来，长期依赖人工饲养，并只以桑叶为食，因此生活环境相对单一。相反，蓖麻蚕处于半驯化状态，其饲料资源丰富，可以进食蓖麻 *Ricinus communis*，也可以食木薯 *Manihot esculenta*、臭椿 *Ailanthus altissima* 等树叶。另一方面，家蚕由于受人工驯化和饲养，对病原微生物的抵抗性较弱，易受多种病害影响；而蓖麻蚕属于野生类型的无滞育期多化性鳞翅目昆虫，在长期的进化过程中，形成了较强的抗逆能力和独特的防御系统，其抗病能力也远较家蚕为强。研究者对蛋白酶抑制剂在外界压力下发生的变化进行了分析，认为其将在物种进化机制中发挥重要作用（Zhao *et al*., 2007）。由此我们认为，蓖麻蚕与家蚕在 CI 种类上的差异，可能与物种分类和生存环境都有关系。

蓖麻蚕作为鳞翅目昆虫的一种，对 CI 的研究既增加了对蓖麻蚕生理生化的了解，也为其他鳞翅目昆虫的胰凝乳蛋白酶抑制剂的研究提供参考。本研究获得了蓖麻蚕的 CI 分布信息，将为进一步研究各种 CI 的功能及害虫的生物防治提供一些很有价值的线索。

参考文献（References）

Bania J, Stachowiak D, Polanowski A, 1999. Primary structure and properties of the cathepsin G/chymotrypsin inhibitor from the larval hemolymph of *Apis mellifera*. *Eur. J. Biochem*., 262(3): 680–687.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*., 72: 248–254.

Carrell RW, 1988. Alzheimer's disease. Enter a protease inhibitor. *Nature*, 331(6156): 478–479.

Christeller JT, 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J*., 272(22): 5710–5722.

Cierpicki T, Bania J, Otlewski J, 2000. NMR solution structure of *Apis mellifera* chymotrypsin/cathepsin G inhibitor-1 (AMCI-1): structural similarity with *Ascaris* protease inhibitors. *Protein Science*, 9(5): 976–984.

Davis BJ, 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci*., 121: 404–427.

Deng LR, Fujii H, Aratake H, Kawaguchi Y, Koga K, 1990. Isolation and properties of two allelic chymotrypsin inhibitors from the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem*., 20(5): 531–536.

Eguchi M, Matsui Y, Matsumoto T, 1986. Developmental change and hormonal control of chymotrypsin inhibitors in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol*., 8411(3): 327–332.

Fröbius AC, Kanost MR, Götz P, Vilcinskas A, 2000. Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem*., 267(7): 2046–2053.

Fujii H, Aratake H, Deng LR, Nakamura M, Kawaguchi Y, Sakaguchi B, 1989. Purification and characterization of a novel chymotrypsin inhibitor controlled by the chymotrypsin inhibitor-A (Ict-A) gene from the larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*., 94(1): 149–155.

Fujii H, Aratake H, Doira H, 1996. Genetic analysis of hemolymph chymotrypsin inhibitors-3 and 4 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Seric. Sci. Jpn*., 65: 385–389.

Fujii H, Aratake H, Doira H, Koga K, 1996. Genetic analysis of chymotrypsin inhibitors in the hemolymph of *Bombyx mori*. *Seric. Sci. Jpn*., 65: 334–341.

Habu Y, Peyachoknagul S, Umemoto K, Sakata Y, Ohno T, 1992. Structure and regulated expression of Kunitz chymotrypsin inhibitor genes in winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC]. *J. Biochem*., 111(2): 249–258.

He N, Aso Y, Fujii H, Banno Y, Yamamoto K, 2004. *In vivo* and *in vitro* interactions of the *Bombyx mori* chymotrypsin inhibitor b1 with *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 68(4): 835–840.

He N, Yakiyama M, Fujii H, Banno Y, Yamamoto K, 2003. Genomic structure and expression analysis of the gene encoding a silkworm basic Kunitz-type chymotrypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1628(1): 71–77.

Kanost MR, 1990. Isolation and characterization of four serine proteinase-inhibitors (Serpins) from hemolymph of *Manduca sexta*. *Insect Biochem*., 20(2): 141–147.

Li J, Zhao P, Dai FY, Sun Q, Xia QY, Xiang ZH, 2006. Polymorphsim distribution of hemolymph chymotrypsin inhibitor (CI) in *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(4): 550–555. [李娟, 赵萍, 代方银, 孙全, 夏庆友, 向仲怀, 2006. 家蚕血液胰凝乳蛋白酶抑制剂的多态性分布. 昆虫学报, 49(4): 550–555]

Liu C, Han Y, Chen X, Zhang W, 2014. Structure-function relationship of SW-AT-1, a serpin-type protease inhibitor in silkworm. *PLoS ONE*, 9(6): e99013.

Mer G, Hietter H, Kellenberger C, Renatus M, Luu B, Lefèvre JF, 1996. Solution structure of PMP-C: a new fold in the group of small serine proteinase inhibitors. *J. Mol. Biol*., 258(1): 158–171.

Rai S, Aggarwal KK, Mitra B, Das TK, Babu CR, 2010. Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Peptides*, 31(3): 474–481.

Suzuki T, Natori S, 1985. Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Biol. Chem.*, 260(8): 5115 –5120.

Tsybina T, Dunaevsky Y, Musolyamov A, Egorov T, Larionova N, Popykina N, Belozersky M, 2004. New protease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Biol. Chem.*, 385(5): 429 –434.

Uriel J, Berges J, 1968. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature*, 218(5141): 578 –580.

Zhao P, Xia QY, Fujii H, Banno Y, 2003. Study on the strain and Individual polymorphism of chymotrypsin inhibitors in haemolymph of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 29(4): 349 –354. [赵萍, 夏庆友, 藤井博, 伴野丰, 2003. 家蚕不同品种与个体的血液胰凝乳蛋白酶抑制剂差异研究. 蚕业科学, 29(4): 349 –354]

Zhao P, Xia QY, Li J, Fujii H, Banno Y, Xiang ZH, 2007. Purification, characterization and cloning of a chymotrypsin inhibitor (CI-9) from the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Protein J.*, 26(5): 349 –357.

Zhao XZ, Zhao QL, Tang SM, Shen XJ, Xu AY, Zhang GZ, Guo XJ, 2007. Investigation of chymotrypsin inhibitor types from haemolymph of the eri silkworm, *Philosamia cynthia ricini*. *Acta Sericologica Sinica*, 30(1): 133 –137. [赵秀振, 赵巧玲, 唐顺明, 沈兴家, 徐安英, 张国政, 郭锡杰, 2007. 蓖麻蚕血液胰凝乳蛋白酶抑制剂种类的调查. 蚕业科学, 30(1): 133 –137]

(责任编辑: 袁德成)